

III. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

R-ПЛАЗМИДЫ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

И. Н. БЛОХИНА, А. М. БОРОНИН, Н. Ф. БРУСНИГИНА,
Е. В. КОЗЛОВА, Н. И. ИВАНОВА, Г. Н. ЛАДЫГИНА

Возникновение и широкое распространение высокоустойчивых к антибиотикам форм микроорганизмов, способных вызывать различные заболевания, затрудняет лечение и осложняет течение болезни.

Цель настоящей работы состояла в изучении генетической природы лекарственной устойчивости клинических штаммов *P. aeruginosa* (вызывает гнойную инфекцию) и госпитальных штаммов *S. typhimurium* (возбудителя брюшного тифа).*

Материалы и методы. В работе использовали 374 клинических штамма *P. aeruginosa*, выделенных в 1979—1983 гг., и 424 госпитальных штамма *S. typhimurium*, выделенных в 1977—1983 гг. Бактериальные штаммы были изолированы в различных лечебных учреждениях страны.

Бактерии выращивали на мясо-пептонном бульоне и агаре. В качестве минимальной среды для *P. aeruginosa* использовали среду В [7], для *E. coli* — среду М-9 [25]. Определение уровней устойчивости псевдомонад и сальмонелл к антибиотикам и солям тяжелых металлов проводили методом двукратных серийных разведений на плотной питательной среде (МПА). Устойчивость штаммов к сульфаниламидам выявляли на среде А с добавлениями гидролизата казеина, никотиновой кислоты и тиамин [26].

Конъюгационный перенос плазмид резистентности *P. aeruginosa* и *S. typhimurium* осуществляли по методам Данна и Гузалуса [14] и Миллера [5]. Реципиентами R-плазмид *P. aeruginosa* и *S. typhimurium* служили полнауксротрофные штаммы *P. aeruginosa* ML 4262 (trp⁻ his⁻ ilv⁻ met⁻ rif^r) и ML 4600 (trp⁻ his⁻) линии PAO и *E. coli* K 12 C 600 5 K (leu⁻ thr⁻ thi⁻ rif^r) и K 12 J 62 (pro⁻ his⁻ trp⁻ nal^r rif^r str^r) соответственно.

Концентрация стрептомицина, канамицина, тетрациклина в среде для селекции и проверки трансконъюгантов *P. aeruginosa* составляла 100 мкг/мл, рифамицина — 200, гентамицина — 6,25, карбенициллина — 700, сульфаниламидов — 6400, хлористой ртути и теллурита калия — 30 мкг/мл, а для селекции и проверки трансконъюгантов *E. coli* — стрептомицина, канамицина, тетрациклина — 25 мкг/мл.

* Разница в подборе штаммов заключалась в том, что *S. typhimurium*, выделенные при спорадических заболеваниях и отличающиеся как по биологическим свойствам, так и по лекарственной устойчивости от госпитальных штаммов, в данном сообщении не представлены.

хлорамфеникола — 20, ампициллина — 50, рифампицина — 100, налидиксовой кислоты — 100, сульфаниламидов — 6400 мкг/мл.

Наличие в штаммах плазмидной ДНК регистрировали по методу Экхардта [15]. Молекулярную массу плазмид определяли путем сравнения их подвижности в агарозном геле с подвижностью плазмид известной молекулярной массы: RSF 1010 (5,5 МД), R6K (24 МД), R222 (64 МД), R40a (96 МД) [19] и SAM (312 МД) [17].

Результаты. Большинство штаммов *P. aeruginosa* (95,2%) резистентны к одному или нескольким лекарственным веществам. Среди них преобладали штаммы, устойчивые к двум антибиотикам (36,9%). Количество штаммов, резистентных к 1, 3, 4, 5, 6 препаратам, составляло соответственно 17,1, 20,3, 12,3, 4,8 и 1,3%. Наиболее часто встречались штаммы *P. aeruginosa*, устойчивые к канамицину (77%) и гентамицину (54,7%). Незначительным оказалось число культур, резистентных к карбенициллину и тетрациклину (табл. 1).

Таблица 1. Устойчивость штаммов *P. aeruginosa* и *S. typhimurium* к антибиотикам

Общее число штаммов, абсолютное число	Количество штаммов, устойчивых к:								
	Km	Gm	Sm	Cb	Tc	Ap	Cm	Su	Hg
<i>P. aeruginosa</i>									
374	284	222	112	38	27			127	101
100	77,0	54,7	30,6	10,5	8,0	x	x	34,0	27,0
<i>S. typhimurium</i>									
424	422		422	x	373	420	370	424	
100	99,5		99,5		88,0	99,0	100	87,3	

Примечание: здесь и в табл. 2—4: Km — канамицин, Gm — гентамицин, Sm — стрептомицин, Cb — карбенициллин, Tc — тетрациклин, Ap — ампициллин, Cm — хлорамфеникол, Su — сульфаниламиды, Hg — хлористая ртуть; x — устойчивость к данным препаратам не исследовалась.

Все штаммы *S. typhimurium* характеризовались полирезистентностью — устойчивостью к 4—8 антибактериальным агентам. При этом большинство культур (85%) было резистентным к действию 6—7 препаратов. Лишь у 11,1% штаммов выявлена устойчивость к 4 лекарственным веществам. С наибольшей частотой (64,2%) у штаммов *S. typhimurium* наблюдалась резистентность к тетрациклину, хлорамфениколу, канамицину, ампициллину, стрептомицину и сульфаниламидам (табл. 1). Незначительное число культур было устойчиво к рифампицину (3,5%) и налидиксовой кислоте (19,8%). Штаммов, устойчивых к гентамицину, не обнаружено.

Анализ уровней лекарственной устойчивости *P. aeruginosa* и *S. typhimurium* показал, что минимальные подавляющие концентрации использованных в работе антибиотиков для большинства культур были высокими и составляли не менее 100 мкг/мл.

Для выяснения природы генетического контроля лекарственной устойчивости клинических штаммов *P. aeruginosa* и *S. typhimurium* изучалась их способность передавать при конъюгации детерминанты резистентности в полиауксотрофные штаммы *P. aeruginosa* ML 4262 (PAO) и *E. coli* K12C600 и J62. В таких скрещиваниях 15% штаммов *P. aeruginosa* и 46% штаммов *S. typhimurium* могли служить донорами детерминант резистентности, что указывает на наличие в этих штаммах конъюгативных R-плазмид. Частота конъюгационного переноса обнаруженных плазмид колебалась от 10^{-3} до 10^{-7} на клетку донора (табл. 2).

Таблица 2. Типы конъюгативных плазмид резистентности, обнаруженные у штаммов *P. aeruginosa* и *S. typhimurium*

Наименование	Характеристика	Молекулярная масса	Частота конъюгационного	Число плазмид данного типа
<i>P. aeruginosa</i>				
pBS601	Km, Gm	40	10^{-6}	18
pBS602	Km Sm, Cm	40	10^{-6}	2
pBS603	Km, Cb	90	10^{-6}	1
pBS604	Sm, Km	200	10^{-7}	3
pBS605	Km, Sm, Hg	70	10^{-5}	2
pBS606	Km, Sm, Gm, Cm	60	10^{-7}	7
pBS607	Km, Gm, Hg	80	10^{-5}	5
pBS608	Sm, Gm, Su	200	10^{-8}	3
pBS609	Km, Cb, Cm	70		1
pBS610	Tc, Cb, Ter	200	10^{-6}	2
pBS611	Km, Cm	98	10^{-7}	4
pBS612	Gm	40	10^{-8}	1
pBS613	Sm	70	10^{-7}	2
pBS614	Sm, Km, Gm, Hg	40	10^{-4}	1
pBS615	Km, Cm, Su, Ter	200	10^{-7}	3
pBS616	Sm, Tc, Gm, Km	70	10^{-6}	2
pBS617	Sm, Gm, Cb, Tc, Hg	40	10^{-5}	2
<i>S. typhimurium</i>				
pBS501	Tc, Cm	64	10^{-3}	139
pBS552	Tc, Sm	60	10^{-5}	1
pBS553	Km	55	10^{-3}	3
	Sm	48	10^{-5}	9
pBS561		73	10^{-8}	4
pBS568	Tc, Cm, Su	70	10^{-4}	9
	Tc, Cm, Km, Ap	96	10^{-4}	15
pBS570	Tc, Cm, Sm, Ap	190	10^{-6}	2
pBS571	Sm, Km, Cm, Su	98	10^{-7}	1
pBS572	Tc, Cm, Ap	70	10^{-5}	13
pBS573	Sm, Km, Ap	70	10^{-5}	8
pBS574	Tc, Cm, Sm	100	10^{-6}	2
pBS575	Tc, Cm, Km, Su	100	10^{-5}	1
pBS576	Tc, Sm, Su	70	10^{-5}	2
pBS577	Km, Ap, Sm, Su	58	10^{-6}	1
pBS578	Sm, Ap, Su	58	10^{-6}	4
pBS579	Sm, Km	2,5	10^{-7}	1
pBS580	Tc, Cm, Ap, Su	56	10^{-5}	4
pBS581	Km, Ap	26	10^{-5}	8

Конъюгативные R-плазмиды *P. aeruginosa* чаще всего контролировали резистентность к канамицину (72%), гентамицину (55,8%) и стрептомицину (32,9%), а R-плазмиды *S. typhimurium* — к тетрациклину и хлорамфениколу (88,8%) (табл. 3).

Таблица 3. Детерминируемая плазмидами резистентность штаммов *P. aeruginosa* и *S. typhimurium*

Число плазмид в трансконъюгантах	Число плазмид, детерминирующих резистентность (абсолютное число)								
	Km	Gm	Sm	Cb	Tc	Ap	Su	Hg	Cm
<i>P. aeruginosa</i>	49	38	24	8	6	x	5	10	14
	64,4	40,6	20,3	10,2	10,2	8,5	17,0	23,6	
<i>S. typhimurium</i>	38		31	x	188	24	22	186	
227	16,7	13,6	13,6	88,8	25,9	9,6	x	88,8	

Помимо генов резистентности к антибиотикам в состав 16,8% плазмид *P. aeruginosa* входили гены, контролирующие резистентность к хлористому ртути; 8,4% плазмид несли гены устойчивости к теллуриту калия (табл. 3).

Электрофоретический скрининг ДНК антибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa* в агарозном геле позволил выявить в 73 штаммах плазмидную ДНК. Проверка трансконъюгантов *P. aeruginosa* и *E. coli*, полученных при скрещивании с *S. typhimurium*, подтвердила присутствие плазмидной ДНК в их клетках. В восьми трансконъюгантах *P. aeruginosa* и 28 трансконъюгантах *E. coli* было обнаружено по два типа плазмидной ДНК с различной молекулярной массой, передающихся при конъюгации совместно.

Молекулярная масса плазмид *P. aeruginosa* составляла от 5 до 300 МД, а плазмид *S. typhimurium* от 2,5 до 190 МД.

Анализ трансконъюгантов позволили выделить 17 типов плазмид *P. aeruginosa* и 19 типов плазмид *S. typhimurium*, различающихся по маркерам резистентности и молекулярным массам (см. табл. 2).

Следует отметить, что у *P. aeruginosa* наиболее распространены плазмиды, несущие гены устойчивости к гентамицину и канамицину, с молекулярной массой 40 МД (30,5%). Для *S. typhimurium* наиболее характерны плазмиды, детерминирующие резистентность к тетрациклину и хлорамфениколу, с молекулярной массой 64 МД (61,3%).

Обсуждение. Анализ резистентности изученных микроорганизмов свидетельствует о широком распространении штаммов, устойчивых к антибактериальным препаратам, как среди *S. typhimurium* (100%), так и среди *P. aeruginosa* (95,2%), что согласуется с данными других исследователей [1, 2, 4, 6, 9, 13, 18, 21, 24].

В изученной коллекции *P. aeruginosa* преобладают штаммы, устойчивые к двум антибиотикам — канамицину и гентамицину. Однако уже известны случаи выделения R-плазмид, обуславливающих устойчивость *P. aeruginosa* к гентамицину при внебольничных инфекциях, вызванных синегнойной палочкой [11, 20, 24].

Как свидетельствуют наши исследования, резистентность к антибиотикам у 15% штаммов *P. aeruginosa* детерминируется конъюгативными R-плазмидами. Эти данные сопоставимы с результатами полученными ранее в СССР Л. А. Анисимовой и А. М. Бороныным [1] и С. Митсухашаи в Японии [21].

Сравнение полученных нами данных с имеющимися [1] показывает значительное снижение встречаемости в составе плазмид псевдомонад генов устойчивости к стрептомицину, тетрациклину, ртути: В то же время наряду с увеличением относительного числа штаммов, устойчивых к канамицину и гентамицину, возросла частота обнаружения плазмид, детерминирующих резистентность к этим антибиотикам.

Интересно отметить, что на фоне уменьшения числа карбенициллинрезистентных штаммов (20% по данным Л. А. Анисимовой [1]; 10% в данной работе) возросло относительное количество штаммов, содержащих плазмиды устойчивости к карбенициллину (2% R-плазмид по данным Л. А. Анисимовой [1]; 21% в данной работе).

Среди изученных штаммов *S. typhimurium* преобладают резистентные к 6 антибактериальным препаратам. О повсеместном распространении в последние годы полирезистентных штаммов *S. typhimurium*, вызывающих госпитальные инфекции, сообщают советские и зарубежные авторы [2, 8, 21, 22, 27].

Наряду с устойчивостью к тетрациклину, хлорамфениколу, канамицину, ампициллину, стрептомицину, сульфаниламидам некоторые зарубежные исследователи отмечают также появление штаммов, устойчивых к гентамицину [12, 16]. Среди *S. typhimurium* нашей коллекции и штаммов, изученных другими отечественными авторами [2, 6], резистентности к гентамицину не обнаружено. Вероятно, это связано с более узким применением гентамицина при кишечных инфекциях в клиниках СССР.

В отличие от *P. aeruginosa*, обладающих высокой природной лекарственной устойчивостью, полирезистентность *S. typhimurium* обусловлена преимущественно присутствием в клетках R-плазмид [3, 10, 21, 22]. Как показали результаты наших экспериментов, частота встречаемости конъюгативных R-плазмид в штаммах сальмонелл в 3 раза выше, чем в штаммах псевдомонад.

У 46% штаммов *S. typhimurium* нашей коллекции, обладающих конъюгативными R-плазмидами, преобладают плазмиды (61,3%), контролирующие резистентность к тетрациклину и хлорамфениколу, что согласуется с данными других авторов [6, 8].

Определение молекулярной массы обнаруженных плазмид позволило выявить отличия в размерах плазмидных молекул ДНК псевдомонад и сальмонелл. Для ДНК плазмид *P. aeruginosa* характерна большая молекулярная масса, чем, вероятно, обусловлена более низкая частота их конъюгационного переноса.

Дальнейшей задачей нашей работы является поиск путей создания эффективных биологических препаратов для борьбы с антибиотикорезистентными возбудителями, в частности препаратов бактериофагов. Уже первые исследования, проведенные совместно с сотрудниками цеха по производству бактериофагов ГНИИЭМ на *S. typhimurium*, показали, что использование комплексных маточных фагов, полученных расами, адаптированными к антибиотикорезистентным штаммам, позволяет получать препараты с широкой валентностью. Однако целенаправленное конструирование эффективных лечебных препаратов бактериофагов требует углубленного изучения отдельных фаговых рас с учетом их генетических характеристик; изучения взаимоотношений отдельных фаговых рас с охарактеризованными штаммами возбудителя; получения мутантов бактериофагов и их изучения. Все эти направления исследований начаты в настоящее время на *P. aeruginosa* и соответствующих фаговых расах.

Таким образом, изученные клинические штаммы *P. aeruginosa* и *S. typhimurium* характеризуются множественной лекарственной устойчивостью, которая детерминирована R-плазмидами у 46% штаммов *S. typhimurium* и 15% штаммов *P. aeruginosa*. Среди R-плазмид *P. aeruginosa* преобладали контролирующие резистентность к канамицину и гентамицину; среди плазмид *S. typhimurium* — к тетрациклину и хлорамфениколу.

Summary

The 374 clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the 424 hospital strains of *Salmonella typhimurium* isolated in 1977–1983 were studied. Most commonly there are found *P. aeruginosa* strains resistant to kanamycin and gentamicin, and *S. typhimurium* strains resistant to tetracycline, chloramphenicol, kanamycin, ampicillin, streptomycin and sulfanilamides. Conjugate R-plasmids were found in 15% of *P. aeruginosa* and 46% of *S. typhimurium*. Plasmids of *P. aeruginosa* more frequently include genes conferring resistance to kanamycin and gentamicin and those of *S. typhimurium* include genes conferring resistance to tetracycline and chloramphenicol. The results of the present work are the part of the study carried out not only for epidemiological observations but also for creating the theoretical and the experimental basis for purposeful development of therapeutic and prophylactic biological preparations.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Далецкий Л. Д., Бородин А. М. Характеристика плазмид резистентности *P. aeruginosa*. Антибиотики, 1981, № 6, с. 450–456.
2. Далецкий Л. Д., Бородин А. М., Бутова А. Е., Бутакова А. Е. Трансмиссивные факторы лекарственной устойчивости в эпидемиологическом анализе сальмонеллезов. — В кн.: Проблемы инфекционной профилактики на Дальнем Востоке. Хабаровск, 1981, с. 107–109.
3. Далецкий Л. Д., Пашков И. П., Наджирев В. М. и др. Конъюгативные R-плазмиды *Pseudomonas aeruginosa*. — Микробиология, 1979, № 4, с. 107–109.

4. Мельникова В. М., Арутчева А. А. Химиотерапия синегнойной инфекции у травматолого-ортопедических больных. — Антибиотики, 1983, № 9, с. 689—693.
5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
6. Покровский В. И., Риее Х., Килессо В. А. и др. Распространение устойчивости к антибиотикам у штаммов *Salmonella typhimurium*, выделенных при различных эпидемиологических ситуациях. — Журнал микробиологии и эпидемиологии, 1982, № 12, с. 60—65.
7. Скрыбин Г. К., Старовойтов Н. И. Альтернативный путь метаболизма нафталина *P. fluorescens*. — Докл. АН СССР, 1975, т. 221, с. 493—495.
8. Тутце Э., Чене Х., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. Изучение молекулярных параметров плазмид *S. typhimurium* определенного фэготипа, проявляющих множественную лекарственную устойчивость. — Молекулярная генетика, микробиол. и вирусология, 1983, № 8, с. 32—34.
9. Anderson E. S. The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. — Ann. Rev. Microb., 1968, vol. 22, p. 131—180.
10. Bezanson G. S., Pauze M., Lior H. Antibiotic resistance and R-plasmids in food chain *Salmonella*: evidence of plasmids relatedness. — Appl. and Environ. Microbiol., 1981, vol. 41, p. 585—592.
11. Bryan L. E., Shahrabadi M. S., Van des Elzen H. M. Gentamicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: R factor—mediated resistance. — Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 1974, vol. 6, p. 191—199.
12. Chugh T. D. Plasmid-linked drug resistance in *Salmonella typhimurium* in Kuwait. — Antonie van Leeuwenhoek J., 1982, vol. 48, N 4, p. 401—405.
13. Dean H. F., Morgan A. F., Asche L. V., Holloway B. W. Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Australian hospitals having R-plasmid determined antibiotic resistance. — Medical J. of Australia, 1977, vol. 2, p. 116—119.
14. Dunn N. W., Gunsalus I. C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *P. putida*. — J. Bacteriology, 1973, vol. 114, p. 974.
15. Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmids desoxyribonucleic acid in bacteria. — Plasmid, 1979, vol. 1, p. 584—588.
16. Glisan G. L., Steel J. H., Whitford H. e. a. Antimicrobial resistance and susceptibility in five bacterial pathogens: a comparison of susceptibility tests in 1974 and 1978. — J. Amer. Vet. Med. Assoc., 1982, vol. 180, N 6, p. 665—668.
17. Hansen J. B., Olsen R. H. Inc P2 group of *Pseudomonas*, a class of uniquely large plasmids. — Nature, 1978, vol. 274, p. 715—717.
18. Jacoby J. A. *Pseudomonas aeruginosa*: clinical manifestation of infection and current therapy. New York, 1979, p. 272—310.
19. Jacob A., Shapiro J., Yamamoto Y. e. a. — In: DNA: Insertion elements, plasmids and episomes. New York, 1977, p. 607—670.
20. Kontomichalou P., Papochristou E., Angelatou F. Multiresistant plasmids from *P. aeruginosa* high resistant to either or both gentamicin and carbenicillin. — Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 1976, vol. 9, p. 866—873.
21. Mitsuhashi S. Bacterial drug resistance — R-Plasmids. Tokyo, 1979, p. 594—637.
22. Lucinescu St., Lucinescu A. M. Studiul rezistentei la chimioterapie a tulpinilor de *Salmonella* izolate in intervalul 1977—1979. — Bacteriologica (Buc.), 1980, vol. 25, p. 179—188.
23. Panhotra B. R., Mahanta J., Garg R. K., Agarwal K. C. Transferable Drug Resistance in *Salmonella typhimurium*. — Indian J. Med. Res., 1981, vol. 73, p. 489—493.
24. Richmond A., Simberkoff M. S., Rahal J. J., Schaeßler S. R-factors in gentamicin resistance organisms causing hospital infection. — Lancet, 1975, vol. 11, p. 1176—1178.
25. Roberts R. B. e. a. — Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*. Washington, 1955, p. 648—669.
26. Sagai H., Hasuda K., Iyobe S. e. a. Classification of R-plasmids by incompatibility in *P. aeruginosa* — Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 1976, vol. 10, p. 573—578.
27. Willshaw G. A., Threlfall E. J., Ward L. R. e. a. Plasmid studies of drug-resistant epidemic strains of *Salmonella typhimurium* belonging to phage types 204 and 193. — J. of Antimicrob. Chemotherapy, 1980, vol. 6, p. 763—773.